

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PATENT
8961-000004/US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No.: 10/632,794 Group Art Unit: 1632
Filing Date: August 4, 2003 Examiner: Unknown
Applicants: Huai-Jen TSAI Conf. No.: 5554
Title: NOVEL TRANSGENIC ZEBRAFISH, GENE
FRAGMENTS AND METHODS FOR PRODUCING
TRANSGENIC ZEBRAFISH

PRIORITY LETTER

December 31, 2003

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sirs:

Pursuant to the provisions of 35 U.S.C. 119, enclosed is/are a certified copy of the following priority document(s).

<u>Application No.</u>	<u>Date Filed</u>	<u>Country</u>
091117396	8/2/2002	R.O.C.
091117397	8/2/2002	R.O.C.

In support of Applicant's priority claim, please enter this document into the file.

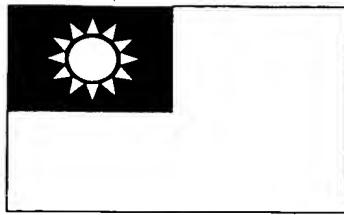
Respectfully submitted,

HARNESS, DICKEY, & PIERCE, P.L.C.

By _____


John A. Castellano, Reg. No. 35,094
P.O. Box 8910
Reston, Virginia 20195
(703) 668-8000

JAC/cah



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，

其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申 請 日：西元 2002 年 08 月 02 日
Application Date

申 請 案 號：091117396
Application No.

申 請 人：邵港科技股份有限公司、蔡懷楨
Applicant(s)

局 長

Director General

蔡 緯 生

發文日期：西元 2003 年 10 月 31 日
Issue Date

發文字號：03221107980
Serial No.

申請日期	91.8.02
案號	091117396
類別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明 新型 名稱	中文	金斑馬魚基因轉殖方法及 新基因片段及新魚種
	英文	
二、發明人 創作	姓名	蔡懷楨
	國籍	中華民國
	住、居所	台北市潮洲街3巷2之6號2樓
三、申請人	姓名 (名稱)	邵港科技股份有限公司
	國籍	中華民國
	住、居所 (事務所)	台北市忠孝東路4段553巷46弄11號
	代表人 姓名	方祖熙

裝訂線

四、中文發明摘要（發明之名稱：

金斑馬魚基因轉殖方法 及新基因片段及新魚種

一種金斑馬魚基因工程方法，係直接選擇架構在公開商業流通使用之 pEGFP-1 質體，及自行改良之 $p\alpha$ -EGFPITR 質體進行基因工程操作；先在 pEGFP-1 質體切出 EGFP 片段後接入含有 CMV 起動子及兩端各有一節 ITR 所形成一新改良之 pEGFPITR 質體，然後再將其中之 CMV 啟動子片段切除；而後再自 $p\alpha$ -EGFP 質體中切出金斑馬魚本身的 α -肌動蛋白基因啟動子；接入前揭 pEGFPITR 質體原 CMV 啟動子空出位置處，而構築一新 $p\alpha$ -EGFPITR 質體之金斑馬魚改良方法；將產

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

訂

線

英文發明摘要（發明之名稱：

四、中文發明摘要（發明之名稱：）

出之新質體放入大腸桿菌 (*Escherichia coli* DH5 α)，即能自動大量無性分裂生殖；再取其線性化質體 DNA 片段，供金斑馬魚受精且尚未分裂之受精卵做細胞質顯微注射轉殖，隨後做受精卵培育，並經螢光顯微鏡觀察，即可見到具有全身骨骼肌肉發綠色螢光表現之胚胎；其育成為具全身骨骼肌肉發綠色性螢光表現之轉殖新品種金斑魚，其子代及後代因繼代遺傳，仍為具全身骨骼肌肉發綠色螢光表現之新品種金斑馬魚者。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

訂

線

英文發明摘要（發明之名稱：）

五、發明說明(一)

(背景說明)

本發明係有關一種金斑馬魚基因工程及基因轉殖方法及其產出之新基因片段及新物種，特別是指一種最快捷、經濟、有效、穩定的來完成，金斑馬魚基因改良之新方法及新基因片段及金斑馬魚新物種。

觀賞魚是漁業生態之一環，屬休閒消費產業，具有世界性廣大商機。因此選擇以高度技術之基因工程及基因轉殖技術，投入低度技術要求之觀賞魚改良品系，應當是可以收到立桿見影，馬到成功之經濟效果。

可惜在以往發表之 DNA 片段設計，均只能讓親代轉殖魚產生相鑲性 (mosaic) 綠螢光，或者產生的螢光很微弱，必需要在螢光顯微鏡固定波長下才可以見到綠色螢光，無法滿足消費者，賞心悅目，爭奇鬥艷之需求，因此不具觀賞魚市場價值。

(發明之概述)

有鑑於此，本案發明人乃經詳思細索，並在觀念上有所突破，選擇以金斑馬魚全身骨骼肌肉表現基因的啟動子，技巧的接入經加工改良之 pEGFPITR 質體，來構築成一新的 $p\alpha$ -EGFPITR 具優質調控 DNA 片段。並以之對金斑馬魚受精但尚未達分裂程度之受精卵做細胞質顯微注射轉殖。以之做為具有全身骨骼肌肉均勻散發表現高度螢光新品種金斑馬魚之培育及繁殖。

本發明主要目的，係在特別選用公開商業流通使用之 pEGFP-1 質體及自行改良之 $p\alpha$ -EGFP 質體，為進行

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(2)

基因工程之主要材料，而達來源取得穩定，改良成本經濟，有利基因工程進行之速效。

本發明再一主要目的係在找出一段主要由(1)金斑馬魚的 α -肌動蛋白基因啟動子；(2)水母綠色螢光基因(Green Fluorescence Protein)；(3)來自線聯病毒(adeno-associate virus)的末端重覆序列(inverted terminal repeats)以及(4)pUC的基本質體，所構築之DNA片段，而達轉殖改良金斑馬魚全身性骨骼肌肉發綠色螢光表現之新品種。

本發明又一目的，係在提供金斑馬魚全身性骨骼肌內發綠色螢光表現新品種之經濟及便捷有效之育成方法。

本發明方法及改良可提供下列五大主要優點：

1. 主要材料 pEGFP-1 質體及 $p\alpha$ -EGFP 質體來源穩定。經濟。
2. 新構築之 DNA 片段，能使金斑馬魚全身性骨骼肌肉發綠螢光。有效果。
3. 新構築之 DNA 片段，轉殖入之胚胎，產生全身性骨骼肌肉發螢光比率高。質佳。
4. 可以穩定的把轉殖外來的基因，遺傳給下一代。可自然經濟的繁殖。質穩。
5. 所產出之新品種金斑馬魚，全身性骨骼肌肉發綠螢光，可以肉眼輕易觀察到，如在短波光照下，更能強化其發螢光之稀有特徵及美感。深具觀賞魚價值。

(請先閱讀背面之注意事項並填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(3)

(發明之圖式說明)

第1圖為 $p\alpha$ -EGFP 質體及進行切出部份示意圖。

第2圖為 pEGFPITR 質體及進行改良部份位置之示意圖。

第3圖為新的 $p\alpha$ -EGFPITR 質體、新的DNA片段示意圖。

第4圖為新的轉殖用DNA片段的基因排序說明圖。

第5圖受本發明新DNA片段轉殖成功胚胎在第三天時，曝光2秒，之F1子代，所啟動綠色螢光之比較示意圖。

第6圖：含綠色螢光基因的DNA片段在金斑馬魚親代(F0)及子代(F1)的表現及遺傳率。

(圖示中參數號數)

10..... $p\alpha$ -EGFP (8.kb) 質體

11.....金斑馬魚本身的 α -肌動蛋白基因啟動 (3.8kb)

12.....pUC 質體

20.....pEGFPITR (5.7kb) 質體 21....CMV 起動子

22....EGFP (RFP 報導基因)

23....SV40 poly A (SV40 病毒之 poly A 序列)

24....ITR (線性病毒的末端重複序列)

25....抗AMP基因片段 (ampicillin resistant gene)

26....ITR (線性病毒的末端重複序列)

27.....pUC 質體

A... (Sal I等) 酶素切割點

B... (NcoI) 酶素切割點

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(4)

(發明之圖式說明)

第1圖為 $p\alpha$ -EGFP 質體及進行切出部份示意圖。

第2圖為 pEGFPITR 質體及進行改良部份位置之示意圖。

第3圖為新的 $p\alpha$ -EGFPITR 質體、新的 DNA 片段示意圖。

第4圖為新的轉殖用 DNA 片段的基因排序說明圖。

第5圖受本發明新 DNA 片段轉殖成功胚胎在第三天時，曝光2秒，之 F1 子代，所啟動綠色螢光之比較示意圖。

第6圖：含綠色螢光基因的DNA片段在金斑馬魚親代(F0)及子代(F1)的表現及遺傳率。

(圖示中參數號數)

10..... $p\alpha$ -EGFP (8.kb) 質體

11..... 金斑馬魚本身的 α -肌動蛋白基因啟動 (3.8kb)

12..... pUC 質體

20..... pEGFPITR (5.7kb) 質體 21....CMV 起動子

22.... EGFP (RFP 報導基因)

23.... SV40 poly A (SV40 病毒之 poly A 序列)

24.... ITR (線性病毒的末端重複序列)

25.... 抗 AMP 基因片段 (ampicillin resistant gene)

26.... ITR (線性病毒的末端重複序列)

27..... pUC 質體

A... (Sal I 等) 酶素切割點

B... (NcoI) 酶素切割點

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(5)

C.... (SalI) 酶素切割點

D... (NcoI 等) 酶素切割點

E....其他酵素之切割點

30..... p α -EGFPITR (8.1kb) 新質體

(發明之詳細說明)

金斑馬魚基因改良工程：

1 · 先行特別設定選用公開商業流通使用之 pEGFP-1 質體，及自行改良之 p α -EGFP 質體，為主要使用材料，以收取得來源穩定、便利及作業省時、省力等有利直接商轉運作之經濟基礎效能。

2 · 先將 pEGFP-1 之 EGFP 片段切出，再接入含有 CVT 起動子及兩端各有 ITR，使之改良成 pEGFPITR 質體，使具有穩定基因表現之機制。

3 · 新質體的構築：

參第一圖，將金斑馬魚本身的 α -肌動蛋白（全身骨骼肌肉表現基因）啟動子 11，用 SalI 及 NcoI 酶素自 p α -EGFP 質體 10 內切出。

參第二圖，再以 SalI 及 NcoI 酶素，將 CMV 起動子 21 從 pEGFPITR 質體 20，內切除。然後再將前揭金斑馬魚本身的 α -肌動蛋白基因（全身骨骼肌肉表現基因）啟動子 11，接入從 pEGFPITR 質體 20 內原 CMV 起動子 21 切出所空出之位置；在 α -肌動蛋白基因啟動子 11 的 5' 端及 SV40 poly A (23) 的 3' 端處各有一個 145dp 之線聯病毒的末端重複序列 (ITR) 24、26。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(6)

參第三圖，完成以上所述基因工程，即可獲得一如第三圖所示之新的DNA片段，即為 $p\alpha$ -EGFPITR 全長約 8.1kb 之新質體 30。在基因設計上，它擁有了(1)金斑馬魚的 α -肌動蛋白基因(全身表現基因)啟動子；(2)水母綠色螢光基因 (Red Fluorescence Protein) (3)來自線聯病毒 (adeno-associate virus) 的末端重覆序列 (inverted terminal repeats) 以及 (4) pUC 的基本質體，等眾多優質基因之組合，因此擁有轉殖改良金班馬魚全身骨骼肌肉發綠色螢光表現之新品種。

而以上建構完成後的新質體 30 放入 *Escherichia coli* 5 α 大腸桿菌中，大量無性分裂生殖。

4·質體的線性化：

參第四圖，取適量 DNA 與 NotI 限制酵素反應後，取少量進行瓊脂凝膠電泳分析，確定質體 DNA 皆被線性化 (8.1Kb)；以等體積 phenol : chloroform (1:1) 純化 DNA、酒精沉澱、風乾沉澱物後，用 PBS 將濃度調整至 $10 \mu g / ml$ 供細胞質顯微注射使用。

5·細胞質顯微注射：

a·受精卵的收集：

顯微注射前一天，晚間 11 點，在恆溫箱即將進入暗週期前，將魚集中於寵物箱中，以隔離網隔離，於隔日早上光週期開始後，每隔 15~20 分鐘收集一次魚卵。每次約可注射 30~40 顆魚卵，一次實驗可注射 250~300 顆左右的卵。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(7)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

b. 顯微注射實驗：

將線性化及定量完成之DNA與含5xPBS之phenol red稀釋混合至所需注射濃度，DNA則利用zebrafish microinjecror(Drummond)吸入毛細管中，注射之毛細管直徑開口為10 μm，以毛細管插入一細胞時期之動物極中，並將DNA注入，所注入的DNA量約為2.3 nl。

c. 受精卵的培育：

將注射過的受精卵以滅菌水清洗，之後放在28.5 °C恆溫箱培養，在胚胎發育至24小時後便可用螢光顯微鏡加以觀察。

6. 融光顯微鏡觀察：

參閱第五圖，將胚胎置於盛有少量水的培養皿中，在螢光顯微鏡(顯微鏡：Leica MZ-12；螢光系統：燈源Hg100W、主要激發波長488 nm、主要吸收波長583 nm、filter set RFP-Plus；照相裝置：MPS60)下，觀察綠色螢光表現及分佈情形。

7. 轉殖基因繼代遺傳：

參閱第六圖，為了培育轉殖基因的繼代遺傳，先將肌肉表現性螢光表現的親代(F0)與野生種交配，得到螢光均勻表現的子代(F1)。再將具有螢光表現的F1與野生種交配得到子代F2，終可得到全螢光表現的子代，並可在一般光源下辨別出轉殖魚，在藍色光源下則更清楚、易辨。

本發明DNA片段，可進一步接入，其他帶有各種螢

五、發明說明(四)

光的基因，如此就可以產生各種螢光的色彩。

本發明可以利用已發綠色螢光的金斑馬魚卵，再接
入其他螢光基因，組成各式各樣的體色。

本發明金斑馬魚新物種，也可以廣泛地被應用到醫
藥等生命科學領域上的研究，例如細胞融合、複製、核
轉移、細胞移動、細胞標的、胚胎發育等研究。

唯以上所述者，僅係本發明部份較佳實施例的說明
而已，故凡應用本發明說明及申請專利範圍所為之等效
方法之變化，理應包含在本發明之專利範圍內。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

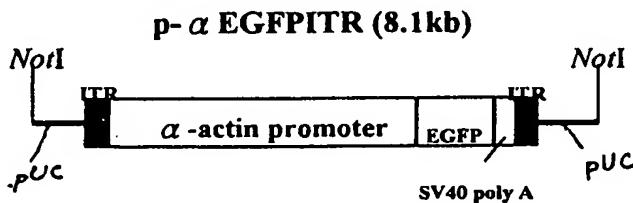
訂

線

1. 一種金斑馬魚基因工程，係直接選擇架構在公開商業流通使用之 pEGFP-1 質體，及 $p\alpha$ -EGFP 質體，進行基因工程操作；
先在 pEGFP-1 質體之 EGFP 切出，再接入含有 CMV 起動子及兩端各有一節 ITR 形成一新改良之 pEGFPITR 質體，然後再將其中一 CMV 起動子切除；而然後再自 $p\alpha$ -EGFP 質體中切出一金斑馬魚本身的 α -肌動蛋白基因啟動子；然後將它接入前揭 pEGFPITR 質體原 CMV 啟動空出位置處，而構築成一新 $p\alpha$ -EGFPITR 優良表現質體，之經濟型金斑馬魚基因改良方法。
2. 依據申請專利範圍第 1 項所述金斑馬魚基因工程，其中自 $p\alpha$ -EGFP 質體中，切出金斑馬魚本身的 α -肌動蛋白基因啟動子，係選用 SalI 及 NcoI 兩種酵素即可輕易完成。
3. 依據申請專利範圍第 1 項所述金斑馬魚基因工程，其中自在 pEGFPITR 質體切出一 CMV 啟動子；係選用 SalI 及 NcoI 兩種酵素即可輕易完成。
4. 一種金斑馬魚新基因片段，主要係以一金斑馬魚的 α -肌動蛋白基因啟動子；一水母綠色螢光基因 (Green Fluorescence Protein)；一來自線聯病毒 (adeno-associated virus) 的末端重覆序列；及一 pUC 的基本質體，等多項優質基因之組合，因此擁有轉殖改良金斑馬魚全身骨骼肌肉發綠色螢光表現之進步能力。

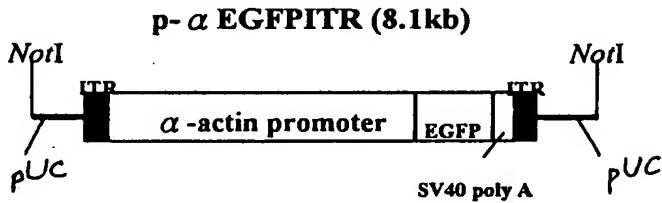
六、申請專利範圍

5. 依據請求專利範圍第4項所述一種金斑馬魚新基因片段之基因排序如下圖所示者：



6. 依據申請專利範圍第4項所述金斑馬魚新基因片段，可以進一步接入，其他帶有各種螢光的基因，混合螢光色彩。

7. 一種金斑馬魚新品種，擁有特殊新基因片段之基因排序如下圖所示者：

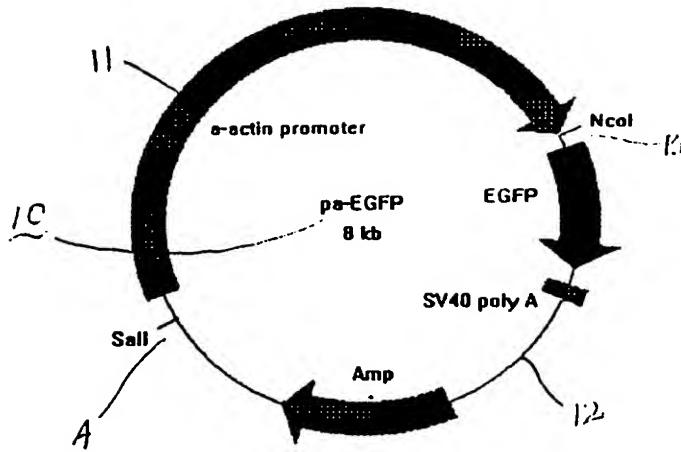


8. 依據申請專利範圍第7項所述金斑馬魚新品種，其全身骨骼肌肉，均勻散發優質的綠色螢光，在一般光源下即能輕易辨別。

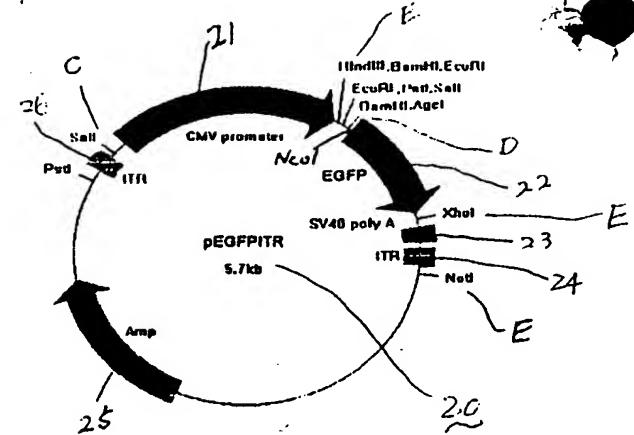
9. 一種金斑馬魚新品種，將已發綠色螢光的金斑馬魚卵，再接入其他螢光基因，產生各式樣螢光體事。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

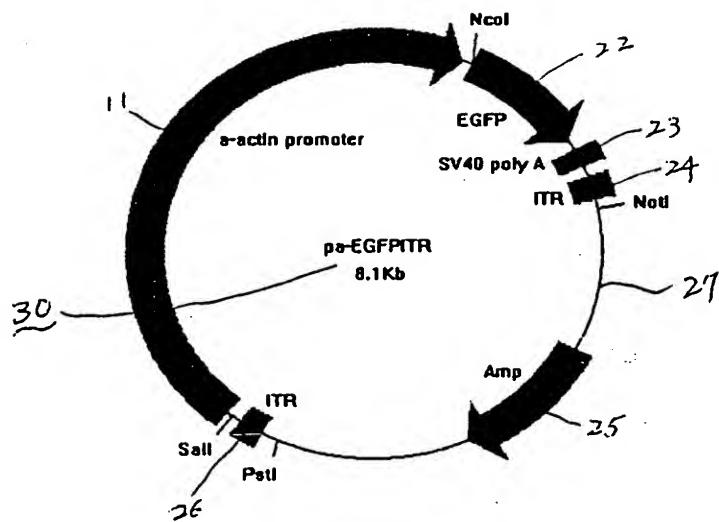
裝
訂
線



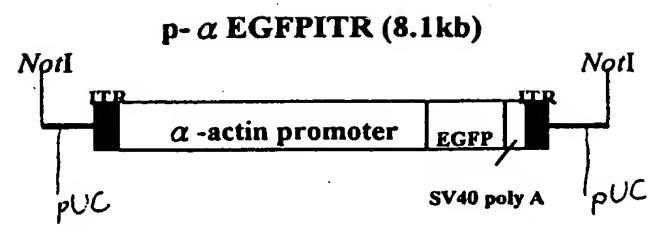
第一圖



第二圖



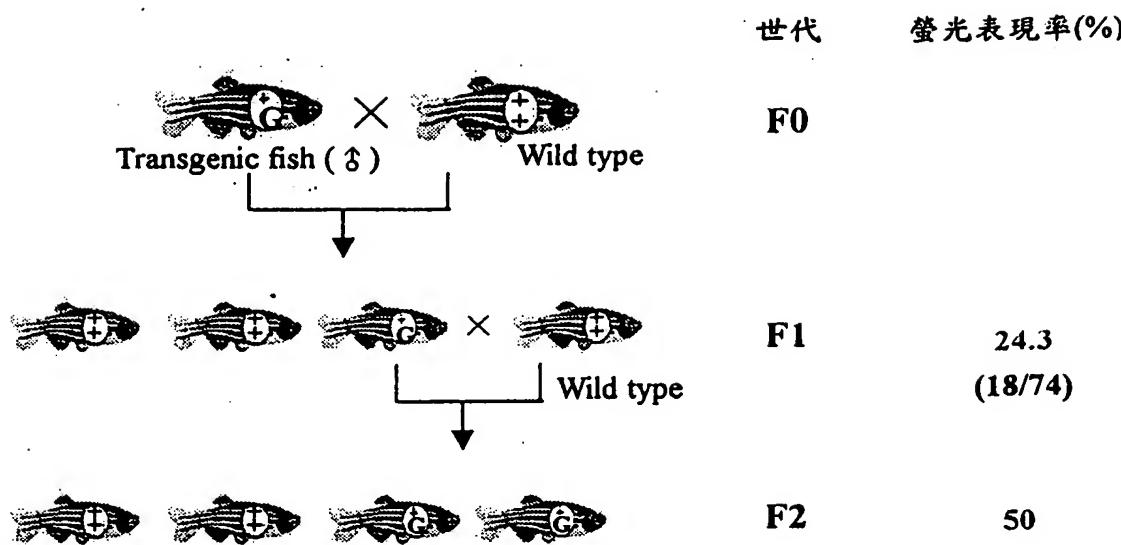
第三圖



第四圖



第五圖



第六圖